

BX

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-273446

(43)公開日 平成10年(1998)10月13日

(51) Int.Cl.  
A 61 K 38/00  
// C 07 K 14/47

識別記号  
ACV

F I  
A 61 K 37/02  
C 07 K 14/47

ACV

審査請求 未請求 請求項の数3 FD (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平9-94989

(22)出願日 平成9年(1997)3月28日

(71)出願人 000006699  
雪印乳業株式会社  
北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号  
(72)発明者 木野崎 雅彦  
栃木県河内郡上三川町ゆうきが丘53-8  
(72)発明者 小川 浩美  
栃木県宇都宮市戸祭2-2-3  
(72)発明者 升永 博明  
栃木県下都賀郡壬生町駅東町25-9  
(72)発明者 小林 文枝  
栃木県河内郡河内町下岡本3777-4  
(74)代理人 弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腎疾患予防及び／又は治療剤

(57)【要約】

【課題】新規な腎疾患予防及び／又は治療剤の提供。  
 【解決手段】TCF-II変異体を有効成分とする腎疾患予防及び／又は治療剤。TCF-II変異体としては、N末端2番目からのアミノ酸配列 Arg-Lys-Arg-ArgをAla-Ala-Ala-Alaに変異させるかまたは27番目からのアミノ酸配列 Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-LysをAla-Ile-Ala-Thr-Ala-Alaに変異させたTCF-II変異体が用いられる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 TCF-IIのN末端2番目からのアミノ酸配列Arg-Lys-Arg-Arg をAla-Ala-Ala-Ala に変異させたTCF-II変異体を有効成分とする、腎疾患予防及び／又は治療剤。

【請求項2】 TCF-IIのN末端27番目からのアミノ酸配列Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys をAla-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala に変異させたTCF-II変異体を有効成分とする、腎疾患予防及び／又は治療剤。

【請求項3】 腎疾患が腎不全である、請求項1又は2記載の腎疾患予防及び／又は治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、TCF-II変異体を有効成分とする、腎疾患予防及び／又は治療剤に関する。本発明の腎疾患予防及び／又は治療剤は、虚血性腎障害、薬物性腎障害、糖尿病性腎症、糸球体腎症、糸球体硬化症、膜性腎症、自己免疫疾患に関連した慢性腎症、及びネフローゼなどの腎疾患、あるいはこれらの疾患を原因とする腎不全の予防及び／又は治療に有用である。

## 【0002】

【従来の技術】従来、虚血性腎障害、薬物性腎障害、糖尿病性腎症、糸球体腎症、糸球体硬化症、膜性腎症、自己免疫疾患に関連した慢性腎症、及びネフローゼなどの腎疾患、あるいはこれらを原因とする腎不全などに対する有効な治療剤は見つかっておらず、臨床の現場では保存療法、即ち症状に合わせた透析、栄養管理、利尿剤あるいは強心剤の投与による悪化因子の除去、あるいはステロイド療法などが行われており、腎臓疾患領域での有効な薬剤が切望されていた。

【0003】TCF-IIは、本発明者らにより見出された、ヒト線維芽細胞IMR-90の產生する腫瘍細胞壞死因子として知られる糖蛋白質であり(WO 90/10651号)、優れた肝臓細胞増殖活性、腎臓細胞増殖活性、抗腫瘍活性などの薬理活性を有することが知られている。TCF-IIは、天然型TCF-IIあるいは遺伝子組換えによるTCF-II等が知られている。さらに、この蛋白質の糖鎖欠失変異体(特表平7-507328号)、あるいは点変異体(WO 96/20214号)などのTCF-II変異体が知られている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上述の状況に鑑み、これらの腎臓疾患に対し有効な物質を求めて鋭意探索した結果、TCF-II変異体、特に点変異体であるTCF-IIのN末端2番目からのアミノ酸配列Arg-Lys-Arg-Arg をAla-Ala-Ala-Ala に変異させたTCF-II変異体、又はN末端27番目からのアミノ酸配列Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys をAla-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala に変異させたTCF-II変異体が腎臓疾患の予防または治療

に対して有効であることを見出した。従って、本発明は、TCF-II変異体を有効成分とする新規な腎疾患予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、TCF-II変異体、特にTCF-IIのN末端2番目からのアミノ酸配列Arg-Lys-Arg-Arg をAla-Ala-Ala-Ala に変異させたTCF-II変異体、又はN末端27番目からのアミノ酸配列Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys をAla-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala に変異させたTCF-II変異体を有効成分とする、腎疾患予防及び／又は治療剤に関する。本発明の腎疾患予防及び／又は治療剤は、虚血性腎障害、薬物性腎障害、糖尿病性腎症、糸球体腎症、糸球体硬化症、膜性腎症、自己免疫疾患に関連した慢性腎症、及びネフローゼなどの腎疾患、あるいはこれらの疾患を原因とする腎不全の予防及び／又は治療に有用である。

## 【0006】

【発明の実施の形態】本発明の有効成分であるTCF-II変異体は、TCF-II変異体の変異導入部位に対応する塩基配列に置き換えたオリゴヌクレオチドを合成し、TCF-II cDNA を錆型としたPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法による部位特異的変異法により調製することができる。このようにして得られたcDNAは適当な発現プロモーター(サイトメガロウィルス(CMV), SRα (Mole. Cell. Biol. vol. 8, No. 1 pp466-472(1988) 及び特開平1-277489号公報)を有したベクター(例えばWO 92/01053号公報)に挿入し、哺乳動物細胞などの真核細胞をトランسفエクトし、この細胞を培養することにより、培養液から目的とするTCF-II変異体を回収、調製することができる。用いられるTCF-II変異体は、TCF-IIに対し人為的に変異を加えたものであればどのようなものでも用いられるが、特に好ましくは、WO 96/20214号公報に開示されるTCF-IIのN末端2番目からのアミノ酸配列Arg-Lys-Arg-Arg をAla-Ala-Ala-Ala に変異させた変異体、又はN末端27番目からのアミノ酸配列Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys をAla-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala に変異させた変異体が用いられる。

【0007】本発明の腎疾患予防及び／又は治療剤は、注射剤として静脈、筋肉内、あるいは皮下に投与することができる。これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じて製造され、必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤等を添加することができる。本発明の製剤を患者に投与する場合、投与患者の症状の程度、健康状態、年齢、体重等の条件によって異なり、特に限定されないが、成人1日当たり精製TCF-IIとして0.6mg～600mg、好ましくは6mg～60mgを含有する製剤を1日1回若しくはそれ以上投与すれば良い。

【0008】以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明する。しかし、これらは単なる例示であって、本発

明はこれらにより限定されるものではない。

### 【0009】

#### 【実施例1】

##### T C F - II変異体の調製

WO 96/20214号公報に開示される方法に従って、天然型T C F - IIのN末端2番目からのアミノ酸配列Arg-Lys-Arg-ArgをAla-Ala-Ala-Alaに変異させた変異体（以下、RKRR2AAAAと表す）、及びN末端27番目からのアミノ酸配列Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-LysをAla-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala（以下、KIKTKK27AIATAAと表す）に変異させた変異体の点変異体2種を調製した。即ち、RKRR2AAIAA cDNAの発現ベクターを含む大腸菌(FERM BP-5266)、およびKIKTKK27AIATAA cDNAの発現ベクターを含む大腸菌(FERM BP-5265)を50μg/mlのアンピシリンを含む培地(400ml)中37℃で振盪培養し、OD 600が1.0になったところで終濃度が0.3mg/mlとなるようにスペクチノマイシン(シグマ社)を添加し、一晩培養した。Maniatisの方法(Molecular Cloning 2nd ed. pp 1.21-1.52(1989), Cold Spring Harbor Laboratory発行)に従い、アルカリSDS法によりプラスミドDNAを分離し、塩化セシウム密度勾配遠心法によりそれぞれの変異体発現プラスミドを精製した。

【0010】得られたこれらの発現プラスミドをCHO細胞に導入した。あらかじめ25μlのTE(10mM Tris-HCl(pH8.0)-1mM EDTA)に溶かしておいた、200μgの発現プラスミドと10μgのプラストサイジン耐性遺伝子発現プラスミドpSV2 bsr(フナコシ社)DNAを、10%牛胎児血清(ギブコ社)を含んだIMDM培地(ギブコ社)0.8mlに懸濁した2×10<sup>6</sup>個のCHO細胞にエレクトロポレーション法で遺伝子導入した。330V, 960μFの条件でエレクトロポレーションを行った後、細胞懸濁液

- (1) T C F - II変異体  
ヒト血清アルブミン

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したものを

- (2) T C F - II変異体  
ツイーン80  
ヒト血清アルブミン

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したものを凍結乾

- (3) T C F - II変異体  
ツイーン80  
ソルビトール

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したものを

- (4) T C F - II変異体  
ツイーン80  
グリシン

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したものを凍結乾

を10分間室温で放置し、10mlの10%牛胎児血清を含むIMDM培地に懸濁し2日間37℃の炭酸ガスインキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)中で培養した。2日後細胞をトリプシン(ギブコ社)処理によりフラスコ底面より剥がし、生細胞数を数えた後、10,000個/ウェルになるように96ウェルプレート(Nunc社)にまき、5μg/mlのプラストサイジン(フナコシ社)を含んだ選択培地200μl/ウェル中で37℃の炭酸ガスインキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)中で培養した。2-3週間後、ウェルあたり50μlの培養上清を取り、エンザイムイムノアッセイ(N.Shima他、Gastrpenterologia Japonica, Vol. 26, No. 4, pp 477-482(1991))を行いT C F - II変異体生産細胞を選びだした。生産細胞を1枚当たり100mlの培地中、50-200枚の225cm<sup>2</sup>フラスコを用い、一枚あたり100mlの培地を用い37℃の炭酸ガスインキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)中で4-7日培養し、5-20Lの培養上清を回収した。この培養上清から、ヘパリンーセファロースCL-6Bカラム(25mm×120mm, ファルマシア社)、Mono Sカラム(5mm×50mm, ファルマシア社)、及びヘパリン5-PWカラム(8mm×75mm, 東ソー社)により各変異体を精製した。得られたT C F - II変異体は、0.01% Tween20を含むリン酸緩衝液(PBS)に対して透析し最終精製品とした。最終精製品については、ローリー法による蛋白質質量定量、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による純度検定、及びアミノ酸シーキエンサーによるアミノ酸配列決定により構造を確認した。

### 【0011】

#### 【実施例2】

##### T C F - II製剤の製造

前述の実施例1で得られたT C F - II変異体の注射剤の製造例を示す。

20 μg

100 mg

凍結乾燥後密封した。

### 【0012】

20 μg

1 mg

100 mg

燥後密封した。

### 【0013】

20 μg

2 mg

4 g

凍結乾燥後密封した。

### 【0014】

20 μg

1 mg

2 g

燥後密封した。

### 【0015】

(5) TCF-II変異体	20 μg
ツイーン80	1 mg
ソルビトール	2 g
グリシン	1 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したものを凍結乾

燥後密封した。

【0016】

(6) TCF-II変異体	20 μg
ソルビトール	4 g
ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成を pH6.03 のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したもの

を凍結乾燥後密封した。

【0017】

(7) TCF-II変異体	20 μg
グリシン	2 g
ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したものを凍結乾

燥後密封した。

【0018】

(8) TCF-II変異体	20 μg
ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分注したものを凍結乾燥後密封した。これらの凍結乾燥品は、使用時に滅菌蒸留水に溶解して用いられる。

【0019】

【実施例3】

#### 塩化第二水銀による腎不全死防御効果

実施例1に従って得られた、TCF-IIの2番目からのアミノ酸を変異させたRKRR2AAAA、及び27番目からのアミノ酸を変異させたKIKTKK27AIATAAを用いて、塩化第二水銀による腎不全死に対する防御効果を試験した。即ち、ICR系雄マウス（体重30～35g；一群20匹）に1日2回、計9回各TCF-II変異体（それぞれ25μg/匹/回）、陽性対照としてTCF-II(25, 50, 100μg/匹/回)、及び溶媒を静脈内投与した。最終投与の6時間後、5mg/kgの塩化第二水銀（和光純薬社）を静脈内投与し、塩化第二水銀による腎不全死に対するTCF-II変異体の防御効果を生存匹数として経時的に観察した。結果を図1及び図2に示す。この結果より、溶媒投与群と比較して、TCF-II及びTCF-II変異体投与群は、明らかに塩化第二水銀による腎不全死を防御した。さらに、TCF-II変異体投与群はTCF-II投与群と比較

して、低用量で同等の活性を示すことが確認された（RKRR2AAAAでは天然型TCF-IIの4分の1量、KIKTKK27AIATAAでは2分の1量）。

【0020】

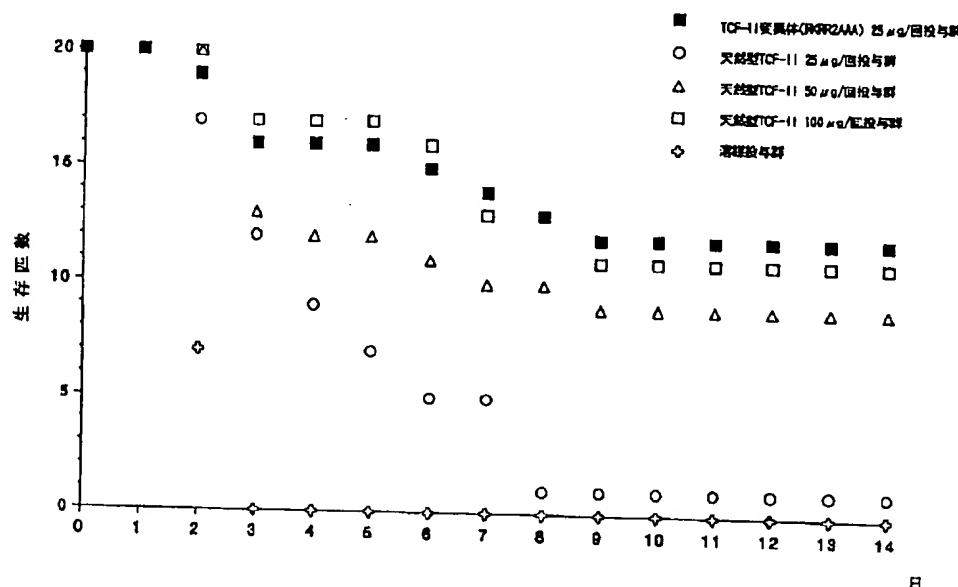
【発明の効果】本発明により優れた腎疾患予防及び／又は治療剤が提供される。本発明は、TCF-IIのN末端2番目からのアミノ酸配列Arg-Lys-Arg-ArgをAla-Ala-Ala-Alaに変異させたTCF-II変異体、又はN末端27番目からのアミノ酸配列Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-LysをAla-Ile-Ala-Thr-Ala-Alaに変異させたTCF-II変異体を有効成分とする、腎疾患予防及び／又は治療剤に関し、虚血性腎障害、薬物性腎障害、糖尿病性腎症、糸球体腎症、糸球体硬化症、膜性腎症、自己免疫疾患に関連した慢性腎症、及びネフローゼなどの腎疾患、さらにこれらの疾患を原因とする腎不全の予防及び／又は治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

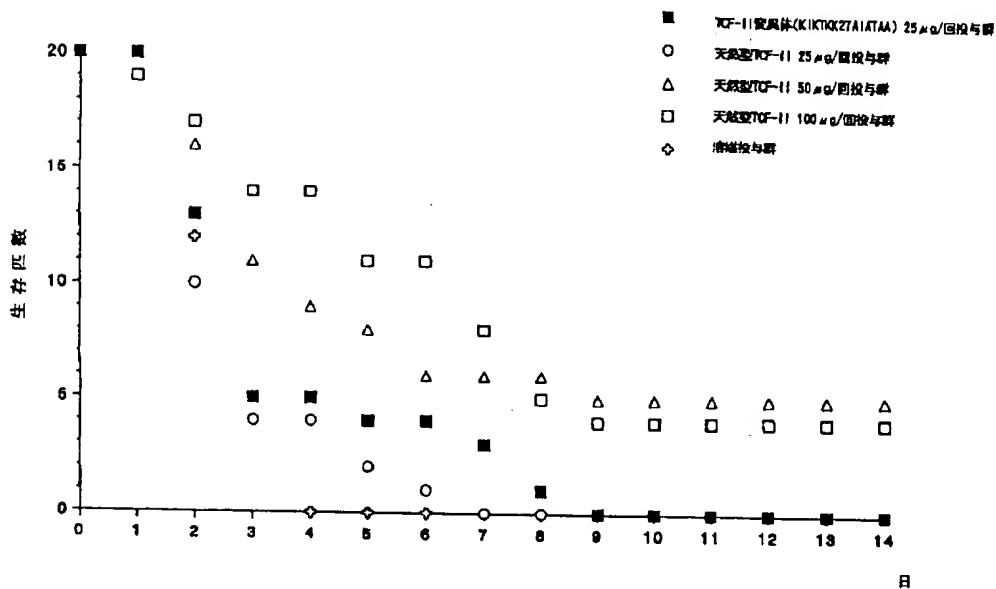
【図1】塩化第二水銀による腎不全死に対する、TCF-II変異体（RKRR2AAAA）の防御効果を示す。

【図2】塩化第二水銀による腎不全死に対する、TCF-II変異体（KIKTKK27AIATAA）の防御効果を示す。

【図 1】



【図 2】



## 【手続補正書】

【提出日】平成9年4月23日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

## 【0011】

## 【実施例2】

TCF-II変異体製剤の製造

前述の実施例1で得られた TCF-II 変異体の注射剤の製造例を示す。

(1) TCF-II 変異体  
ヒト血清アルブミン20 μg  
100 mg

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量  
を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlづつ分

注したもの凍結乾燥後密封した。

---

フロントページの続き

(72)発明者 山口 京二  
埼玉県大宮市島町702-12 ライオンズガ  
ーデン東大宮1-524

(72)発明者 東尾 侃二  
埼玉県川越市山田1769-10

BX

## Specification

Agent for preventing and/or treating renal disease

Technological field

The present invention relates to an agent for preventing and/or treating renal disease comprising point mutant TCF-II mutant as an effective ingredient. The agent for preventing and/or treating renal disease of the present invention is useful for preventing and/or treating renal diseases such as chronic nephropathy related with ischemic renal disorder, drug-induced renal disorder, diabetic nephropathy, glomerular nephropathy, glomerulosclerosis, membranous nephropathy, autoimmune disease and nephrose or renal insufficiency caused by the above.

Background technology

Any effective therapeutic agent for renal diseases such as chronic nephropathy related with ischemic renal disorder, drug-induced renal disorder, diabetic nephropathy, glomerular nephropathy, glomerulosclerosis, membranous nephropathy, autoimmune disease and nephrose or renal insufficiency caused by the above has not been found so far. In a clinical practice, only maintenance therapy, that is,

removal of derangement by dialysis, management of nutrition or administration of diuretic or cardiac or steroid therapy is carried out considering symptoms. Therefore, an effective drug in renal diseases is eagerly desired.

TCF-II is a glycoprotein(WO 90/10651) found by the present inventors which is known as Tumor Necrosis Factor produced by human fibroblast IMR-90 and has excellent pharmacological activities such as an activity of proliferating hepatocyte, an activity of proliferating renal cell, an anti-tumor activity and so on. Naturally occurring TCF-II and recombinant TCF-II are known. Further, a mutant protein without carbohydrate chain and a point mutant TCF-II (WO 96/20214) are also known.

#### Disclosure of the invention

Considering the above situations, the present inventors eagerly investigated to look for an effective substance for these renal diseases and found that TCF-II mutant, especially, a TCF-II mutant which is a point mutant of amino acid sequence at the second from N-terminal, that is, from Arg-Lys-Arg-Arg to Ala-Ala-Ala-Ala or another TCF-II mutant whose amino acid sequence at 27 th from N-terminal was changed into Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala from Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys, was effective for preventing and/or treating renal diseases. Accordingly,

an object of the present invention is to provide a novel agent for preventing and/or treating renal diseases comprising TCF-II mutant as an effective ingredient.

The present invention relates to an agent for preventing and/or treating renal diseases comprising TCF-II mutant, especially, a TCF-II mutant which is a point mutant of amino acid sequence at the second from N-terminal, that is, from Arg-Lys-Arg-Arg to Ala-Ala-Ala-Ala or another TCF-II mutant whose amino acid sequence at 27 th from N-terminal was changed to Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala from Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys, as an effective ingredient. The agent for preventing and/or treating renal disease of the present invention is useful for preventing and/or treating renal diseases such as chronic nephropathy related with ischemic renal disorder, drug-induced renal disorder, diabetic nephropathy, glomerular nephropathy, glomerulosclerosis, membranous nephropathy, autoimmune disease and nephrose or renal insufficiency caused by the above.

Point mutant TCF-II of an effective ingredient of the present invention can be prepared by synthesizing oligonucleotide substituted with corresponding base sequence to mutation site of TCF-II mutant, followed by site-directed mutagenesis using TCF-II cDNA as a template by polymerase chain reaction (PCR) method. cDNA obtained as above can be inserted into a vector having an appropriate expression promoter

(Cytomegalovirus (CMV), SR $\alpha$  (Mol. Cell. Biol. vol. 8, No. 1 pp466-472(1988)) and Japanese unexamined laid-open patent application No. 277489(1991)), followed by transfection thereof into eukariotic cell such as mammalian cell. TCF-II mutant desired can be prepared by recovering it from culture medium of the culture of the above transfected cell. As TCF-II mutant used in the present invention, any TCF-II with an artificial mutation can be used but, more preferably, a TCF-II mutant whose amino acid sequence at the second from N-terminal, was changed from Arg-Lys-Arg-Arg to Ala-Ala-Ala-Ala or another TCF-II mutant whose amino acid sequence at 27th from N-terminal was changed to Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala from Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys (these mutants were described in WO 96/20214) can be used.

The agent for preventing and/or treating renal diseases of the present invention can be administered intravenously, intra muscularly or subcutaneously as injections. This pharmaceutical preparation can be manufactured according to a known method of manufacturing pharmaceutical preparation and, if necessary, a pH conditioner, buffer, stabilizer etc. can be added thereto. Dose of the pharmaceutical preparation of the present invention can vary depending on degree of severeness of symptom, health conditions, age, body weight and will not be limited, but for an adult person per day pharmaceutical preparation containing 0.6 mg-600 mg of TCF-II, preferably 6 mg-60 mg,

can be administered once or more per day.

#### Brief description of the drawings

Figure 1 shows defensive effect of TCF-II mutant (RKRR2AAAA) against death caused by renal insufficiency induced with mercuric chloride in example 3.

Figure 2 shows defensive effect of TCF-II mutant (KIKTKK27AIATAA) against death caused by renal insufficiency induced with mercuric chloride in example 3.

#### Best embodiment for practice of the invention

The present invention will be described in more detail. However, these are only exemplification and will not limit the present invention.

#### [Example 1]

##### Preparation of TCF-II mutant

According to a method described in WO 96/20214, two species of point mutant, that is, a TCF-II mutant whose amino acid sequence at the second from N-terminal was changed from Arg-Lys-Arg-Arg to Ala-Ala-Ala-Ala (hereinafter referred to RKRR2AAAA) and another TCF-II mutant whose amino acid sequence at 27th from N-terminal was changed from

Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys to Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala (hereinafter referred to KIKTKK27AIATAA) were prepared. That is, shaking culture of E.coli comprising an expression vector of RKRR2AIAA cDNA (FERM BP-5266) and E col. comprising an expression vector of KIKTKK27AIATAA cDNA was carried out in L-medium (400 ml) containing 50  $\mu$ g/ml ampicillin at 37°C. When OD 600 became 1.0, spectinomycin (Sigma) was added so that the final concentration thereof would be 0.3 mg/ml, and the culture medium was cultured overnight. According to the method of Maniatis (Molecular Cloning 2nd ed. pp1.21-1. 52(1989), Cold Spring Harbor Laboratory), plasmid DNA was separated by alkaline SDS method and the expression plasmodia of each mutant was purified by cesium chloride density gradient centrifugation.

These obtained expression plasmodia (200  $\mu$ g) were introduced into CHO cell. The expression plasmodia (200  $\mu$ g) and expression plasmodia of pSV2 of blasticidin resistant gene (10  $\mu$ g/Funakoshi) DNA which were dissolved in TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA) in advance, were transfected into  $2 \times 10^6$  CHO cells suspended in 0.8 ml of IMDM culture medium (Gibco) containing 10% calf fetal serum by electroporation. After electroporation carried out under the conditions of 330 V and 960  $\mu$ F, cell suspension was left at room temperature for 10 minutes, suspended in 10 ml IMDM culture medium containing 10% calf fetal serum and cultured in a CO<sub>2</sub> incubator (5%

$\text{CO}_2$ ) at 37°C for 2 days. After 2 days since then, cells were deprived from the bottom of flask by trypsin (Gibco) treatment and the number of viable cells was counted and cells were disseminated in 96-well plate (Nunc) so as to be 10,000 cells/well, which was cultured in 200  $\mu\text{l}$  selected medium/well containing 5  $\mu\text{g/ml}$  blastosidine (Funakoshi) at 37°C in  $\text{CO}_2$  incubator(5%  $\text{CO}_2$ ). After 2-3 weeks, 50  $\mu\text{l}$  of culture supernatant was taken from each well and, by enzyme-immuno-assay thereof (N. Shima et.al., *Gastropenterologia Japonica*, vol. 26, No. 4, pp477-482 (1991)), cells producing TCF-II mutant were selected. TCF-II mutant producing cells were cultured in 50-200 flasks (each volume is 225  $\text{cm}^2$ ) containing 100 ml of culture medium at 37°C in a  $\text{CO}_2$  incubator (5%  $\text{CO}_2$ ) for 4-7 days and 5-20 L of cultured supernatant was recovered. Each mutant was purified from the above culture supernatant using Heparin-Sepharose CL-6B column (25 mm x 120 mm, Pharmacia), Mono S column (5 mm x 50 mm, Pharmacia) and Heparin 5-PW column (8 mm x 75 mm, Toso). Obtained TCF-II mutant was dialyzed against phosphate buffer solution (PBS) containing 0.01% Tween 20 to be the final product. The protein determination of the final product was carried out by Lowry method and the purity thereof was examined by SDS electrophoresis and, then, amino acid sequencer thereof confirmed amino acid sequence.

[Example 2]

Manufacturing of pharmaceutical preparation of TCF-II

An example of manufacturing injections of recombinant TCF-II obtained in example 1 was shown.

(1) TCF-II Mutant                    20  $\mu$  g

human serum albumin        100 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(2) TCF-II Mutant                    20  $\mu$  g

Tween 80                            1 mg

human serum albumin        100 mg

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(3) TCF-II Mutant                    20  $\mu$  g

Tween 80                            2 mg

Sorbitol                            4 g

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(4) TCF-II Mutant                  20  $\mu$  g

Tween 80                  1 mg

Glycine                  2 g

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(5) TCF-II Mutant                  20  $\mu$  g

Tween 80                  1 mg

Sorbitol                  2 g

Glycine                  1 g

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(6) TCF-II Mutant                  20  $\mu$  g

Sorbitol                  4 g

human serum albumin        50 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(7) TCF-II Mutant                  20  $\mu$  g

Glycine                  2 g

human serum albumin          50 mg

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(8) TCF-II Mutant                  20  $\mu$  g

human serum albumin          50 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

These lyophilized products will be dissolved in sterilized distilled water on use.

[Example 3]

Defensive effect against death caused by renal insufficiency induced with mercuric chloride.

Defensive effect of TCF-II mutant against death caused by renal insufficiency induced with mercuric chloride was examined using RKRR2AAAA mutated at the second amino acid from N-terminal of TCF-II

RKRR2AAAA in which the amino acid residues from the N-terminal of TCF-II and KIKTKK27AIATAA in which the amino acid residues from the 27th amino acid, which were obtained in example 1.

That is, one of TCF-II mutants (25  $\mu$ g/mouse/time), TCF-II as positive control (25, 50, 100  $\mu$ g/mouse/time), or vehicle was administered intravenously to male ICR mice (body weight:30-35 g; n=20 per group) twice daily (total 9 times). At 6 hours after the final administration, 5 mg/kg mercuric chloride (Wako-junyaku) was administered intravenously, and the survival of mice was monitored to examine the protective effect of TCF-II mutant on mortality. The results are shown in figure 1 and figure 2. From the results, the TCF-II treatment and TCF-II mutant treatment apparently protected the mortality caused by mercuric chloride - induced renal failure, compared to the vehicle treatment. Furthermore, the activities of TCF-II mutants were more potent than that of TCF-II (RKRR2AAAA was four times and KIKTKK27AIATAA was two times as potent as native TCF-II).

#### Industrial applicability

The present invention provides an agent for preventing and/or treating renal diseases.

The present invention is useful for preventing and/or treating

renal diseases such as chronic nephropathy related with ischemic renal disorder, drug-induced renal disorder, diabetic nephropathy, glomerular nephropathy, glomerulosclerosis, membranous nephropathy, autoimmune disease and nephrose or renal insufficiency caused by the above, comprising TCF-II mutants, that is, a TCF-II mutant in which amino acid sequence at the second from N-terminal of TCF-II was changed from Arg-Lys-Arg-Arg to Ala-Ala-Ala-Ala and another TCF-II mutant in which amino acid sequence at the 27th from the N-terminus was changed from Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys to Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala as an effective ingredient.

Reference of Microorganism

1) Organization of Deposition

National Institute of Bioscience and Human-Technology,

Agency of Industrial Science and Technology,

Ministry of International Trade and Industry

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan

Date of Deposition: November 10, 1994

(The microorganism was originally deposited above of November 10, 1994, and transferred to the deposit based on the Treaty on October 25, 1995)

Accession Number: FERM BP-5265

2) Organization of Deposition

National Institute of Bioscience and Human-Technology,

Agency of Industrial Science and Technology,

Ministry of International Trade and Industry

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan

Date of Deposition: November 10, 1994

(The microorganism was originally deposited above of November 10, 1994, and transferred to the deposit based on the Treaty on October 25, 1995)

Accession Number: FERM BP-5266

**Claim**

1. An agent for preventing and/or treating renal disease comprising a TCF-II mutant with point mutations.
2. An agent for preventing and/or treating renal disease according to claim 1 said mutant TCF-II is TCF-II mutant in which amino acid sequence at the second from the N-terminal of TCF-II was changed from Arg-Lys-Arg-Arg to Ala-Ala-Ala-Ala as an effective ingredient.
3. An agent for preventing and/or treating renal disease according to claim 1 said point mutant TCF-II is TCF-II mutant in which amino acid sequence at the 27th from the N-terminal of TCF-II was changed from Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys to Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala as an effective ingredient.
4. The agent for preventing and/or treating renal diseases according to anyone of claim 1 to claim 3 wherein said renal disease is renal insufficiency.

## Abstract

The present invention provides an agent for preventing and/or treating renal disease comprising TCF-II a point mutant as an effective ingredient. As TCF-II, a TCF-II mutant in which amino acid sequence at the second from N-terminus was changed from Arg-Lys-Arg-Arg to Ala-Ala-Ala-Ala or another TCF-II mutant in which amino acid sequence at the 27th from the N-terminus was changed from Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys to Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala can be used.

Fig. 1

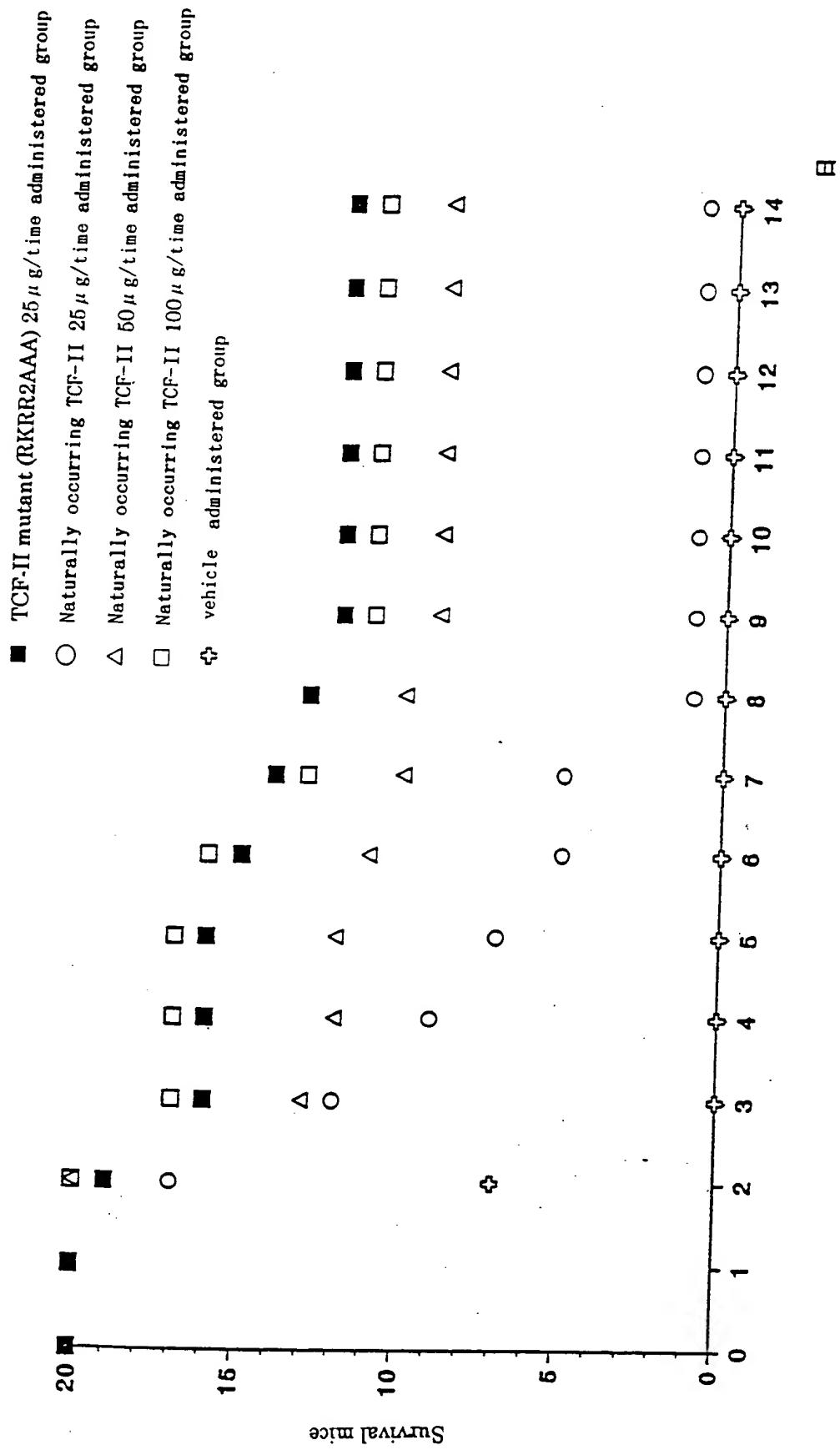


Fig. 2

